

BEATRIZ CALDERARI VIANNA

**INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM ÉGUAS
COM SÊMEN CONGELADO, “*IN NATURA*” E DILUÍDO.**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre. Curso de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias,
Universidade Federal do Paraná

Orientador: Prof. Dr. Romildo Romualdo Weiss

CURITIBA
2000



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa de Tese da Candidata ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária **BEATRIZ CALDERARI VIANA** após a realização desse evento, exarou o seguinte Parecer:

1) A Tese, intitulada **"INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM ÉGUAS COM SÊMEN CONGELADO, "IN NATURA" E DILUIDO"** foi considerada, por todos os Examinadores, como um louvável trabalho, encerrando resultados que representam importante progresso na área de sua pertinência.

2) A Candidata se houve muito bem durante a Defesa de Tese, respondendo a todas as questões que foram colocadas.

Assim, a Comissão Examinadora, ante os méritos demonstrados pela Candidata, atribuiu o conceito "B" concluindo que faz jus ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área de Patologia Veterinária.

Curitiba, 11 de Dezembro de 2000.


Prof. Dr. ROMILDO ROMUALDO WEISS
Presidente/Orientador


Prof. Dr. LUIZ ERNANDES KOZICKI
Membro


Prof. Dr. RÜDIGER DANIEL OLLHOFF
Membro

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre me deu forças para que pudesse chegar onde estou.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em especial Ana Sílvia Passerino e João Luis Androukovitch os quais estiveram sempre comigo nos bons e maus momentos durante o curso.

A CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Luiz Ernandes Kozicki meu co-orientador pelas incansáveis cobranças e paciência para comigo.

À Prof^a.Dr^a. Itaíra Susko e Prof^a Suely Rodaski pela amizade e tempo destinado a me ouvir e aconselhar, sempre que precisei.

A Murilo Nichele pelo companheirismo, carinho, força e acima de tudo paciência.

Ao Professor Metry Bacila pelos seus ensinamentos e incentivo.

Ao Prof. Dr. Romildo Romualdo Weiss, meu orientador, que realmente me orientou e orienta acadêmico e profissionalmente. Uma pessoa sensível com quem pude contar nos maus e bons momentos fora da Universidade. A Ele, meu respeito, admiração e agradecimento infinito por muitas vezes confiar animais sob suas responsabilidade aos meus cuidados. Obrigada!

A minha Família, especialmente minha irmã Cláudia por conseguir conviver comigo nos muitos momentos de stress e desânimo.

A meu Pai.

À minha avó, M^a de Lourdes, pessoa da qual tenho orgulho e admiração por ser uma fortaleza.

Aos colegas e amigos da Natação.

Aos meus cães IRK, ZULA e SISTER.

Aos funcionários, proprietários, clientes e amigos envolvidos no segmento eqüino, obrigada pelo seu crédito.

Aos cavalos, seres maravilhosos, minha paixão.

Finalmente, agradeço por tudo o que a vida me oferta.

À minha querida MÃE, que tenho certeza, está com as estrelas torcendo por mim e iluminando o meu caminho.

***Deus nos dá a terra para semearmos
Podemos plantar flores,
Deixá-la ociosa,
Permitir que ervas daninhas cresçam
Ou fazê-la dar frutos...
Assim é nossa vida,
Somos os jardineiros responsáveis por ela***

Dedico este trabalho a minha MÃE (in memoriam)

SUMÁRIO

LISTA DE GRÁFICOS.....	ix
LISTA DE QUADROS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUÇÃO.....	14
1 OBJETIVOS.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 INSEMINAÇÃO COM SÊMEN “ <i>IN NATURA</i> ” E DILUÍDO.....	17
2.2 CIO DO POTRO E MORTE EMBRIONÁRIA.....	21
2.3 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL ANTES E APÓS A OVULAÇÃO.....	24
2.4 SÊMEN CONGELADO.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 EXPERIMENTO A.....	36
3.2 EXPERIMENTO B.....	38
3.3 EXPERIMENTO C.....	39
4 RESULTADOS.....	41
4.1 EXPERIMENTO A.....	41
4.2 EXPERIMENTO B.....	42
4.3 EXPERIMENTO C.....	43
5 DISCUSSÃO.....	47
5.1 EXPERIMENTO A.....	47

5.3 EXPERIMENTO C.....	48
6 CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS	54

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - ÍNDICES DE PRENHEZ EM ÉGUAS INSEMINADAS COM SÊMEN CONGELADO NO CIO DO POTRO, CIO INDU- ZIDO COM PGF2 α E 30º DIA PÓS-PARTO ANTES E APÓS A OVULAÇÃO.....	44
GRÁFICO 2 - ÍNDICE DE PRENHEZ EM ÉGUAS INSEMINADAS COM SÊMEN CONGELADO.....	46
GRÁFICO 3 – ÍNDICE DE REABSORÇÃO EMBRIONÁRIA NAS ÉGUAS INSEMINADAS COM SÊMEN CONGELADO.....	46

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1- PLANO EXPERIMENTAL.....	35
-----------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - RESULTADOS DE ÉGUAS INSEMINADAS COM AUXÍLIO DO ESPÉCULO DE POLANSKY E VIA MANUAL.....	42
TABELA 2 - RESULTADOS DE ÉGUAS INSEMINADAS COM SÊMEN “ <i>IN NATURA</i> ” E DILUÍDO.....	43
TABELA 3 - RESULTADOS DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM ÉGUAS COM SÊMEN CONGELADO ANTES E APÓS A OVULAÇÃO.....	44
TABELA 4 - RESULTADOS DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL NA ÉGUA COM SÊMEN CONGELADO.....	45

RESUMO

Objetivando comparar a eficiência reprodutiva de dois métodos distintos de Inseminação Artificial (através de espéculo de Polansky e condução manual de pipeta), com diferentes características de sêmen (“*in natura*” e diluído), e a eficiência em diferentes tempos de inseminação do sêmen congelado em diferentes grupos de éguas (antes e após a ovulação), foram utilizadas 425 éguas das raças Crioula e Brasileiro de Hipismo com idades variando entre três e 14 anos, oriundas de propriedades da Região Metropolitana de Curitiba. Os animais foram subdivididos em três grupos experimentais: A- aqueles que seriam inseminados com sêmen “*in natura*” (n=160) através da técnica com espéculo de Polansky (n=80) e pipeta orientada manualmente (n=80); B- animais inseminados com sêmen diluído (n=142) e C- com sêmen congelado (n=123), antes (n=65) e após a ovulação (n=58). O acompanhamento do ciclo estral foi realizado através de ultra-sonografia e palpação retal. O diagnóstico de gestação foi realizado nos dias 16 e 17 pós-ovulação para as inseminações com sêmen congelado e fresco respectivamente. A eficiência reprodutiva das duas técnicas de inseminação (Polansky e Manual) foi de 76,25% e 75% respectivamente, não diferindo significativamente entre si. A eficiência reprodutiva dos resultados da inseminação com sêmen diluído e “*in natura*” foram 74,3% e 75,5% respectivamente. Os resultados de gestação da inseminação antes e após a ovulação nas éguas inseminadas no 20º e 30º dia pós-parto não diferiram significativamente entre si. Quanto à incidência de reabsorção embrionária entre as éguas inseminadas no cio do potro e as inseminadas no cio induzido com PGF2 α houve diferença significativa favorecendo o segundo grupo de éguas.

ABSTRACT

The aim this experiment was compare the reproductive efficiency of two different methods from Artificial Inseminations (through Polansky's speculum and manual conduction of pipette), with different semen characteristics ("*in natura*" and diluted), and the efficiency in different times of insemination of the frozen semen in different groups of mares (before and after the ovulation) 425 mares of the Creole and Brazilian Jump horse races were used with ages varying three to 14 years, originating from properties of the Metropolitan Area of Curitiba. The animals were divided in three experimental groups: A- those that would be inseminated with semen "*in natura*" (n=160) through the technique with Polansky's speculum (n=80) and pipette guided manually (n=80); B- Animals inseminated with diluted semen (n=142), and C- with frozen semen (n=123), before (n=65) and after the ovulation (n=58). The accompaniment of the estral cycle was accomplished through ultrasonografic and rectal palpation as well as the gestation diagnosis, which was accomplished in the 16th and 17th days after the ovulation for the inseminations with frozen and fresh semen respectively. The reproductive efficiency of the two insemination techniques (Polansky and Manual) it was respectively of 76,25% and 75%, not differing significantly to each other. The reproductive efficiency of the results of the insemination with diluted semen and "*in natura*" was 74,3% and 75,5% respectively. The results of pregnancy of the insemination before and after the ovulation in the mares inseminated in 20th and 30th post parturition day didn't differ significantly to each other. With relationship to the incidence of embryonic reabsorption among the mares inseminated in the foal heat to inseminated them in the estrous induced with PGF2 α there was significant difference favorable for the second group of mares.

INTRODUÇÃO

A criação de cavalos destinados ao segmento esportivo sofreu um grande aumento nas últimas décadas. O plantel aumentou rapidamente sem que existisse número adequado e proporcional de bons garanhões a disposição nas temporadas reprodutivas. Esse fato, aliado as vantagens econômicas e sanitárias, vem proporcionando crescente aceitação no uso de diferentes biotécnicas ligadas à reprodução.

Entre as diferentes biotecnologias atualmente empregadas, a inseminação artificial é a que demonstra a maior viabilidade econômica e facilidade na implantação entre diferentes espécies domésticas onde seu uso já se tornou consagrado.

Dentro da espécie eqüina atualmente, nas raças que permitem o uso da inseminação artificial, essa técnica vem sendo empregada com bons índices de fertilidade, além de proporcionar menor desgaste do garanhão e possibilitar o progresso genético do plantel existente.

A inseminação artificial com sêmen fresco "*in natura*" apresenta resultados encorajadores, mas a presença do garanhão no local de inseminação é fator limitante, e a utilização de sêmen fresco, diluído ou congelado, surge como solução ideal.

Numerosos diluidores vêm sendo utilizados para resfriar, armazenar, transportar e congelar o sêmen de garanhões, e sua finalidade é favorecer a longevidade máxima das células espermáticas, embora se saiba que existe enorme variação e imprevisibilidade de tolerância das células frente aos diluidores e técnicas de resfriamento e congelamento.

Apenas 50% dos garanhões, com sêmen "*in natura*" considerado normal, apresentam boas taxas de fertilidade após o descongelamento.

Atualmente existem várias técnicas de diluição, resfriamento e congelamento, que vêm sendo empregadas na espécie eqüina com diferentes taxas de sucesso. Estes índices dependem, além da tolerância do sêmen do reprodutor, do diluidor ou da técnica utilizada, de fatores ligados à égua e ao manejo destes animais.

1 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar a fertilidade do sêmen eqüino fresco, diluído e congelado com diferentes técnicas, em diferentes horários de ovulação e de inseminação artificial.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL COM SÊMEN “*IN NATURA*” E DILUÍDO

A técnica de Inseminação artificial na espécie eqüina ainda apresenta limitações relacionadas ao melhor aproveitamento do sêmen (VOSS E PICKET, 1976).

A possibilidade de aumentar o número de éguas servidas por um garanhão em uma temporada, a redução da transmissão de doenças venéreas e do risco de acidentes de cobertura, a eliminação do custo do transporte até o garanhão e estresse da égua e do potro, e a utilização da técnica em éguas que apresentam pouca resistência as infecções uterinas (HUGUES e LOY, 1970), são algumas das vantagens oferecidas pela inseminação artificial com sêmen fresco.

O sêmen “*in natura*” tem desvantagens como a tendência aglutinação, e neste caso a concentração espermática é maior do que as percentagens de espermatozóides móveis viáveis (KENNEY, 1975).

Diluindo-se o sêmen, há a prevenção da aglutinação espermática e a redução das influências de concentração e pH seminal (KENNEY, 1975).

O plasma seminal tem influenciado o transporte dos espermatozóides em varias espécies, inclusive no cavalo (CLAVERT et al., 1985; MANN et al., 1956; OVERSTREET, 1983).

O plasma seminal contém vários hormônios, enzimas e metabólitos, mas muito pouco se sabe sobre a função destes componentes no cavalo. Não existe uma evidência direta sobre o papel do plasma seminal no transporte do sêmen, também do plasma seminal eqüino em ser de grande importância na sobrevivência e no transporte do sêmen na égua (TROEDSSON et al., 1988).

O plasma seminal de eqüinos, em contraste ao do carneiro, contém quantidades de prostaglandinas (MANN et al., 1981), mas a liberação de ocitocina pela pituitária em resposta a rufiação de éguas no cio a garanhões foi recentemente reportada (ALEXANDER et al., 1995).

Os índices de fertilidade obtidos com a utilização da inseminação artificial com sêmen fresco "*in natura*" em eqüinos tem sido semelhantes (MERKT, 1976; ALLEN et al., 1976; PALMER, 1984) ou até superiores (VOSS e PICKET, 1976) aos da monta natural. BEDFORD e HINRINCHS (1984), obtiveram excelentes taxas de prenhez com sêmen fresco "*in natura*" (90%). Testes de fertilidade foram realizados com sêmen resfriado mostrando taxas de prenhez variando de zero a 75% (PICKETT, 1993; HAMILTON et al., 1984).

O efeito do plasma seminal no diluente utilizado para refrigerar o sêmen eqüino não tem sido adequadamente estabelecido. Na presença do leite, o plasma seminal parece ter um efeito positivo. HEISKANEN et al. (1987), registraram bons resultados após guardarem a fração rica do sêmen; JASKO et al. (1992), descreveram um efeito positivo de uma pequena quantidade de plasma seminal na motilidade. Na ausência do leite, BEDFORD et al. (1995), mostraram uma interação negativa entre o plasma seminal e a gema de ovo, entretanto, ele utilizou um tempo de armazenamento que foi muito pequeno para discriminar entre a presença e ausência de plasma seminal no diluente com leite.

A adição de diluentes ao sêmen visa proteger os espermatozóides de condições ambientais desfavoráveis, prolongar sua sobrevivência (PICKETT e AMANN, 1987; BRISKO e VARNER, 1992) bem como aumentam a viabilidade do sêmen de garanhões subférteis (BLANCHARD et al., 1987). Diversos diluentes com

as mais variadas formulações já foram utilizados para preservar sêmen eqüino (PICKETT et al., 1975).

Grandes números de diluidores têm sido utilizados para diluir, resfriar, armazenar, transportar e congelar o sêmen de garanhões.

Pretende-se com sua utilização, reduzir perdas de espermatozóides no equipamento de inseminação, quando são utilizados pequenos volumes de sêmen altamente concentrado, prolongar a viabilidade dos espermatozóides, incorporar antibióticos no sentido de reduzir o número de bactérias introduzidas no útero de éguas, e permitir o resfriamento, o armazenamento e o transporte a longas distâncias, bem como o congelamento do sêmen (PICKETT e VOSS, 1975).

Os diluentes a base de leite são conhecidos, por serem de alta praticidade e são efetivos na proteção do espermatozóide durante o armazenamento antes da inseminação artificial. O leite é um fluido biológico com uma composição complexa e contém componentes os quais são benéficos e prejudiciais ao espermatozóide (BATELLIER et al., 1998).

O número total de espermatozóides que chegam ao oviduto até 4h após a inseminação, com sêmen fresco diluído, é significativamente maior para garanhões férteis comparados aos subférteis (SCOTT et al., 1995).

O transporte e a sobrevivência do sêmen no trato reprodutivo da égua parece não diferir entre o sêmen fresco e congelado (TROEDSSON et al., 1998).

Os componentes básicos dos diluidores tem sido: a água, os tampões e as substâncias não iônicas, macromoléculas séricas do leite e da gema de ovo, açúcares, antibióticos e crioprotetores.

No que se refere às taxas de concepção obtidas e as várias características reprodutivas, avaliadas para o diluidor de NAGASE e NIWA (1964), a modificação do

diluidor pela retirada do glicerol, de sua formulação original, permitiu obter altas taxas de concepção, similares às observadas para o sêmen "*in natura*".(PICKETT e VOSS, 1975).

De maneira geral, tem sido demonstrado pela maioria dos pesquisadores, um efeito contraceptivo do glicerol sobre a fertilidade do sêmen do eqüino (PICKETT e VOSS, 1975; LOMIS et al., 1983, PALMER, 1984 e ARNS et al., 1987), com taxas de concepção no primeiro ciclo de 40 a 57% e total de 70 a 90%.

Os resultados obtidos apontam índices de fertilidade superiores com a utilização da inseminação artificial com sêmen fresco diluído do que com a monta natural. Estes dados coincidem com os achados de VOSS e PICKETT (1976), com a utilização de sêmen "*in natura*". Esta superioridade deu-se principalmente pela diminuição da contaminação bacteriana após a inseminação artificial.

No momento da cobertura, o pênis do garanhão carrega uma série de debris e microorganismos, próprios e do meio exterior, que são depositados diretamente no lúmen uterino causando uma infecção uterina (KENNEY et al., 1975). A maioria das éguas consegue eliminar essa contaminação até 96 horas após e ficam livres da infecção antes que o embrião esteja no útero (HUGUES e LOY, 1969).

MATTOS (1995), demonstrou que o fator diluição leva a uma redução da concentração bacteriana no sêmen diluído em comparação ao sêmen "*in natura*". Este fato, associado ao fracionamento do ejaculado e conseqüente diminuição do volume, faz com que o número de bactérias introduzidas no interior do útero, com inseminação artificial e com sêmen diluído, seja menor que com a monta natural.

A adição de diluentes ao sêmen prolonga significativamente a manutenção da motilidade. De fato, os diluentes são considerados o fator mais importante na preservação dos espermatozóides (MANN e LUTWAK-MANN, 1981), e existe um

consenso quanto à capacidade dos diluentes protegerem e prolongarem a vida das células espermáticas (PICKETT e AMANN, 1987).

HEISKANEN et al. (1994), observaram que o sêmen diluído sustentou sua capacidade fertilizante por mais de 80 horas quando coletado, diluído e utilizado em inseminações artificiais até 12 após a ovulação.

2.2 CIO DO POTRO E MORTE EMBRIONÁRIA

Tendo em vista que a égua apresenta um longo período gestacional, com média próxima aos trezentos e quarenta dias (JENNINGS, 1941; BLANCHARD et al., 1989), há um prazo de cerca de 25 dias entre o parto e uma nova concepção para que o intervalo entre partos seja menor de doze meses.

Como característica, a égua apresenta o primeiro cio pós-parto entre o 4º e o 18º dia sendo este conhecido como “cio do potro” (MATHEUS et al., 1967), porém os índices de fertilidade deste cio são inferiores aos demais (CASLICK, 1937; JENNINGS, 1941; TRUM, 1950; GINTHER, 1979; MERKT e GÜNZEL, 1979; LIEUX, 1980; KOSKINEN e KATILA, 1987 e MATTOS e CAVALHEIRO, 1988).

Segundo ROCHA et al. (1976), a utilização do cio do potro para cobertura de éguas deve ser estimulada, pois permite que boa parte das éguas fique prenhes já no primeiro cio, fato que representa uma diminuição do intervalo interpartos.

De acordo com SILVA et al. (1987), a fertilidade das éguas no cio do potro é inferior, resultando em índice de prenhez de 66,6%. MERKT (1984), cita que a reabsorção embrionária é mais comum nas coberturas realizadas no cio do potro e que esta aumenta quando se utiliza a inseminação artificial com sêmen congelado.

Éguas que conceberam no cio do potro têm aumento da incidência de perda embrionária devido à alta produção de leite e conseqüente balanço energético

negativo da égua. Outros estudos indicam um aumento na morte embrionária nos dias 25º a 31º em éguas mal alimentadas, enquanto que a restrição de dietas de éguas com gestação gemelar normalmente resulta da perda de um embrião (BELL E BRISTOL, 1987).

Por ocasião do cio do potro, há um ambiente adverso fisio e histologicamente ao desenvolvimento do embrião. A esse efeito soma-se o fato de que, entre o 6º e o 10º dia pós-parto, 50 a 90% das éguas apresentam alta contaminação por bactérias facultativamente patogênicas no útero, inclusive *Streptococcus β -hemolítico* (WEISS et al., 1976; GIGAX et al., 1979; NAGLIC et al., 1980; RIDEOUT et al., 1982).

Rejeição imunológica e anormalidades cromossômicas usualmente resultam em mortes embrionárias e geralmente não são detectadas (TOLSDORF, 1976).

Alguns fatores são apontados como causa desta baixa fertilidade. Dentre estes se destaca a involução uterina incompleta (TOLSDORF, 1976; POPE et al., 1979; SEXTON e BRISTOL, 1985; SALTIEL et al., 1987) e processos inflamatórios do endométrio que ocorrem durante o parto e cópula (GIGAX et al., 1979). A involução uterina estaria relacionada com o intervalo parto ovulação e LOY (1980) e BELL e BRISTOL (1987), observaram uma maior taxa de concepção nas éguas que ovularam após o 10º dia, semelhante ao encontrado por McKINNON (1988), que observou prenhez superior nas éguas que ovularam após o 15º dia.

Na perda embrionária antes do 12º dia pós-ovulação, a luteólise ocorre como um ciclo normal e a égua normalmente entra em cio antes do 21º dia. Como citado na literatura, fatores ambientais, particularmente aqueles que causam stress em éguas prenhes são importantes causas de morte embrionária (SILVA et al., 1987).

Durante 1985, a ultra-sonografia transretal foi utilizada para estudar a perda embrionária em éguas de cria. Treze por cento dos diagnósticos de prenhez

positivos foram subsequenteiramente perdidos na oitava semana pós-ovulação. A idade avançada da égua foi associada com um histórico de endometrite e aumento da perda embrionária. WOODS (1989), concluiu que alguns casos importantes de perda embrionária em éguas subférteis ocorreram antes do período de 7-9 dias pós-ovulação.

Segundo CARNEVALE e GINTHER (1992), uma contratibilidade uterina insuficiente poderia resultar em uma redução da mobilidade do embrião, um contato insuficiente do mesmo com o endométrio e consequentemente luteólise e perda embrionária.

Duas alternativas podem ser utilizadas para que se evite a morte embrionária. O atraso do cio do potro e o adiantamento do segundo cio pós-parto. Este poderá ser realizado com a utilização de análogos da prostaglandina (TOLKSDORF, 1976; KLUG et al., 1977; BURNES et al., 1979) onde os autores revelaram que o método retarda o momento da primeira cobertura pós-parto, facilitando a involução uterina e aumentando a proliferação glandular do endométrio.

Mecanismos envolvidos na involução uterina tais como: contração uterina, evacuação de conteúdos uterinos, restauração da superfície epitelial e fagocitose bacteriana são estimulados pelos níveis de estrógenos circulantes (VANDEPLASSCHE et al., 1983; EVANS et al., 1986; HAYES e GINTHER, 1986; JONES et al., 1990).

Os níveis de progesterona são importantes para a manutenção da função endometrial e prenhez (BELL E BRISTOL, 1987).

A produção de progesterona pelo corpo lúteo é muito importante durante o início da prenhez. A hipofunção do corpo lúteo pode resultar em subdesenvolvimento de atividades funcionais para a manutenção. O estímulo inadequado das células da

granulosa na ovulação pelo LH poderia resultar na formação de um corpo lúteo impróprio (BELL E BRISTOL, 1987).

2.3 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL ANTES E APÓS A OVULAÇÃO

A frequência de coberturas ou de inseminações é um dos aspectos mais importantes do manejo reprodutivo de eqüinos, embora tenha merecido reduzida consideração da literatura. Ela depende, fundamentalmente, da individualidade do garanhão e do tipo de sêmen a ser utilizado.

Igualmente importantes para o sucesso da concepção, são a motilidade progressiva, morfologia espermática, acompanhamento sistemático do desenvolvimento folicular, a determinação do momento da ovulação, a duração da viabilidade do óvulo no sistema genital da égua bem como a qualidade do ambiente uterino (SILVA FILHO, 1994; SILVA FILHO et al., 1998).

O período de sobrevivência dos gametas no sistema genital da égua foi motivo de estudos já na década de 40 (ZIVOTKOV, 1941; SKATIN, 1943; LAIG, 1943), quando se observaram melhores resultados com inseminações artificiais realizadas até 48 h antes da ovulação ou no momento de sua ocorrência, em relação às realizadas após a ovulação (58 a 100% de concepção total) com sêmen fresco.

Quanto às inseminações após a ovulação, PICKETT et al. (1987), e WOODS et al. (1990), consideraram-nas viáveis dentro de 12 h da sua ocorrência, quando os resultados foram semelhantes aos de inseminações antes da ovulação. No entanto, KATILA et al. (1988), obtiveram fecundação em até 18-24 h após a ovulação, embora os resultados fossem melhores em até 12-18 h após a sua ocorrência.

Segundo HUNTER (1990), a partir de 12h após a liberação do ovócito, torna-se significativo um processo de degeneração nuclear que leva ao pareamento imperfeito dos cromossomos no processo de mitose do zigoto, levando a morte do embrião. Assim, no experimento de KATILA et al. (1988), em que a taxa de concepção total foi de 46%, após inseminações artificiais de zero a 27 h após a ovulação, houve uma queda para 29%, devido às perdas embrionárias.

O período de viabilidade do espermatozóide e ovócito *in vivo* é bastante controverso. Esta variabilidade determina o intervalo máximo da inseminação artificial e ovulação, capaz de proporcionar boa fertilidade (WOODS et al., 1990). Alguns trabalhos comparam a fertilidade de éguas cobertas em diferentes intervalos antes e/ou após a ovulação (ZIVOTKOV, 1940; LAIG, 1943; KEDROV, 1945; CHENG, 1965; KAMHI e VARADIN, 1965; PALMER, 1964; WOODS et al., 1990), com um decréscimo da taxa de prenhez proporcional ao aumento do intervalo da cobertura a ovulação (KAMHI e VARADIN, 1965). Deve-se ressaltar que a ovulação na égua ocorre de 24 - 48 horas antes do final do cio (VAN RENSBURG e VAN HERDEN, 1953).

A associação de inseminações artificiais antes e após a ovulação proporciona maior segurança em relação à viabilidade espermática no momento da ovulação.

Comparando inseminações realizadas 24h antes com inseminações de 24-48 h antes da ovulação com as inseminações realizadas de zero a 12h após a ovulação, HEISKANEN et al. (1994), obtiveram melhor resultado com o segundo grupo. No entanto, o intervalo de até 12h para a inseminação artificial após a ovulação garantiu a fecundação eliminando a necessidade de maior sobrevivência espermática.

ALIEV (1981), trabalhando com sêmen congelado, não observou diferença quanto às taxas de concepção total entre intervalos de 2 a 48h entre as inseminações.

LIMA (1995), não obteve diferença entre os grupos de 48, 24 antes e 48h mais uma inseminação até 24h após a ovulação.

Para CHENG (1965), quanto mais próxima da ovulação for à inseminação com sêmen diluído, mais alta será a taxa de concepção. Já PALMER (1964), trabalhando com éguas inseminadas de 24 a zero e zero a 12 h antes da ovulação e 12 a 24 h após a ovulação, obteve uma fertilidade por ciclo de 50%, 47% e 18% respectivamente.

O espermatozóide eqüino pode aparentemente ser armazenado e é capaz de sobreviver por um longo tempo no trato reprodutivo de éguas. Por outro lado, a fertilidade ocorre mesmo quando éguas são inseminadas após a ovulação (WOODS, 1990). Isto sugere que o sêmen armazenado por um tempo prolongado no trato reprodutivo da fêmea não seja submetido à capacitação no cavalo (TROEDSSON, 1998).

Somente uma pequena porção do ejaculado/dose inseminada migra com sucesso ao local de fertilização. Uma eliminação de sêmen através da cérvix na vagina ocorre com horas de inseminação (BADER e KRAUSE, 1980).

Esta rápida eliminação de sêmen pelo útero coincide com um aumento na atividade mioelétrica seguida à inseminação e pode, entretanto, ser o resultado da atividade uterina em resposta a inseminação. Quando éguas foram inseminadas com sêmen fresco, 25% de perda de espermatozóides na vagina foram observados com poucas horas após a inseminação (BADER e KRAUSE, 1980).

A perda retrógrada de espermatozóides foi maior seguida da inseminação com sêmen diluído (74%) ou sêmen congelado (96%). Nenhum mecanismo foi determinado que poderia explicar estas diferenças entre o sêmen fresco e diluído ou congelado, mas alteração da membrana celular e danos durante a manipulação do sêmen foram sugeridos pelos autores como causas potenciais (TROEDSSON et al., 1998). Parece, entretanto que a endometrite pós-cobertura é transitória e fisiológica, com o propósito de se eliminar o excesso de espermatozóides, produtos seminais e contaminantes do útero. Isto ajudaria o útero a providenciar um ambiente que é compatível com a sobrevivência de um embrião quando o mesmo vem para o lúmen uterino em 5 dias pós-fertilização (TROEDSSON et al., 1998).

O plasma seminal pode agir como um modulador inflamatório no útero e no mínimo, em parte, ser responsável pela natureza transitória induzida pela cobertura. Baseado em observações clínicas, a inflamação uterina induzida parece ser maior quando a égua é inseminada com o sêmen congelado (sendo que o plasma é removido), comparado ao sêmen diluído (com o plasma seminal). Em adição, ingredientes nos diluidores para o congelamento de sêmen, como a gema de ovo e o glicerol podem causar uma resposta inflamatória no útero. Entretanto, o diluidor contendo somente gema de ovo, causa uma inflamação quando infundido no útero de éguas em cio (KOTILAINEN et al., 1994).

De acordo com PICKETT (1993), a inseminação com sêmen congelado antes da ovulação precisa ser realizada com 12-24h para que se obtenham as melhores taxas de prenhez. Isto pode ser comparado a adequadas taxas de concepção quando com sêmen fresco, a inseminação é realizada com dois a três dias antes que ovulação ocorra (BRINSKO e VARNER, 1993). A concepção tem sido reportada

seguida da inseminação de éguas com 6 dias antes da ovulação, com sêmen fresco (BURKHANDT, 1949; DAY, 1942).

Em contraste, taxas de prenhez são reportadas por ambos, sêmen fresco e congelado quando éguas são inseminadas com 6h após a ovulação (KLOPPE et al., 1988; WOODS et al., 1990).

KEDROV (1945), obteve taxas de concepção de éguas inseminadas com sêmen fresco antes e após a ovulação de 51,8% e 56% , respectivamente. BELLING (1984), obteve 75,05% de éguas gestantes com coberturas pós-ovulação e KOSKINEN et al. (1990) obteve 100 % de fertilidade para éguas inseminadas dentro do período de 18 h pós-ovulação. Para WOODS et al. (1990), para éguas inseminadas antes da ovulação ou no dia da ovulação com sêmen congelado (63 versus 55%, respectivamente), foram semelhantes à fertilidade obtida por PALMER (1984) de 47 a 66%, para éguas inseminadas apenas uma vez, de zero a 72 h após a ovulação. As taxas de concepção totais obtidas por CHALOUB et al. (1996), com inseminações 48 e 24 h antes da ovulação foram 48% e 60% e após a ovulação de 59,52%, semelhantes às apresentadas por ZIVOKTOV (1941), KEDROV (1945), CHENG (1965), com sêmen fresco e WOODS et al. (1990), para as éguas inseminadas em períodos similares, antes da ovulação com sêmen congelado. KAMHI e VARADIN (1965), obtiveram uma taxa de concepção total de 92, 5% para éguas cobertas 24h antes da ovulação.

SAMPER (1998), afirmou que as éguas inseminadas uma vez com 12h após a ovulação, obtiveram uma taxa de prenhez significativamente menor que as éguas inseminadas uma vez antes da ovulação, 30 a 60% respectivamente. SAMPER (1991), afirma que se o sêmen a ser utilizado é de pobre qualidade, a inseminação deveria ser efetuada em éguas com 6 h antes da ovulação. Em geral, o sêmen de

muitos garanhões deveria ser utilizado o mais próximo possível da ovulação. WOODS et al. (1990), observou taxas de prenhez acima de 30% no máximo de 12-24 h após a ovulação. Entretanto, taxas de prenhez satisfatórias têm sido alcançadas utilizando-se sêmen congelado antes da ovulação (COCHRAN et al., 1983; CRISTANELLI et al., 1983).

Ambos, KLOPPE et al. (1988), e BARTACINI et al. (1999), têm reportado taxas satisfatórias de prenhez seguidas de inseminações após a ovulação acima até de 6h. Nenhum destes autores investigou os resultados da inseminação com sêmen congelado por mais de 6h. McKINNON (1996), sugeriu que isto resultaria em baixas taxas de prenhez enquanto PACE e SULLIVAN (1975) observaram mais gestações resultadas de inseminações em 12h após a ovulação que em 12h antes.

SILVA et al. (1987), obtiveram os mesmos índices de concepção em éguas inseminadas antes e após a ovulação (66,6%) no cio do potro. Já, em éguas inseminadas com potro ao pé excluindo-se o cio do potro, este índice aumentou em 20-38% nas éguas inseminadas antes da ovulação.

MERKT (1984), sugere que seja feita a inseminação artificial após a ovulação, pois seus resultados foram superiores quando utilizou este momento para inseminar.

Segundo BELLING (1984), apenas uma cobertura/inseminação após a ovulação é viável e traz como conseqüências benéficas por coleta de sêmen: redução na sobrecarga do garanhão, redução de prováveis traumas e infecções com éguas e garanhões, aumento do número de éguas a serem servidas por um garanhão em uma estação possibilitando um maior retorno do investimento.

O espermatozóide eqüino encontra-se no oviduto com 2h após a inseminação em éguas pós-ovuladas, podendo ser encontrado até 4h após a inseminação (BADER, 1982).

Quando éguas são inseminadas antes da ovulação, espermatozóides móveis, com acrossoma intacto (77%) de um garanhão fértil, podem ser encontrados no istmo caudal do oviduto até 4h após a inseminação (SCOTT et al., 1994).

O transporte de espermatozóide ao oviduto pode estar completo em 4h após a inseminação. As taxas de concepção são significativamente prejudicadas quando éguas são submetidas a lavagens uterinas com 30 minutos a duas horas após a inseminação, mas, a lavagem uterina não terá algum efeito adverso na fertilidade se a mesma for realizada com 4h após a inseminação (BRINSKO, 1990; BRINSKO 1991).

Acredita-se que espermatozóides férteis são requisitados e armazenados em um local específico no oviduto até que a ovulação ocorra. O istmo caudal em muitas espécies parece ser o local de armazenamento de espermatozóides e sugere-se que essa região seja um reservatório de espermatozóides antes da ovulação no trato reprodutivo de éguas (BADER, 1982; SCOTT et al., 1994). Foi recentemente demonstrado que as concentrações de cálcio intracelular foram mantidas a níveis basais no espermatozóide, quando o mesmo encontrava-se em contato com as células epiteliais do oviduto, desta forma prevenindo a capacitação espermática. A liberação do espermatozóide de seu reservatório é influenciada pelo horário da inseminação, mas este mecanismo não é plenamente compreendido (DROBNIS e OVERSTREET, 1992).

Entretanto, estudos *in vitro* sugerem que a capacitação pode ser um fator na separação do espermatozóide pelo oviduto (DROBNIS e OVERSTREET, 1992).

O transporte do sêmen e a sobrevivência do espermatozóide no trato reprodutivo de éguas variam entre garanhões férteis e subférteis, entre éguas férteis e subférteis e entre sêmen fresco e congelado (DROBNIS e OVERSTREET, 1992).

É de consenso dos autores que, quanto mais próxima da ovulação for realizada a inseminação, maiores serão os índices de concepção.

2.4 SÊMEN CONGELADO

O primeiro estudo relatando a prenhez obtida com sêmen congelado de garanhão foi publicado por BAKE e GANDIER em 1957. Na década de 60, pesquisadores japoneses conseguiram congelar e armazenar sêmen de garanhões a -70°C (NISHIKAWA et al., 1968).

No Brasil, o método de congelamento e armazenamento de sêmen eqüino foi introduzido na década de 70, sendo executado no Departamento de Medicina Veterinária da UFPR (WEISS, 1976).

Para que o sêmen fertilize um óvulo viável, diferentes processos precisam ocorrer. O espermatozóide precisa ser transportado e mantido no local de fertilização no oviduto, além de que necessita ser capacitado para que possa penetrar no óvulo. A motilidade do espermatozóide é necessária para a penetração no óvulo, e enzimas precisam ser liberadas através da reação acrossômica. Após a penetração espermática da Corona radiata e zona pelúcida do óvulo, o segmento equatorial do espermatozóide precisa ser hábil a fundir-se com a membrana celular do ovócito, o qual irá “pinocitar” o espermatozóide. Até o momento não foi possível de distinguir os espermatozóides capazes de fertilização daqueles que não o são. Muitas considerações têm mostrado fatores que são necessários para a manutenção da motilidade espermática e metabolismo na avaliação da qualidade do sêmen.

Entretanto, fatores como características bioquímicas e mudanças no espermatozóide e plasma seminal, contratilidade uterina e microambiente do trato

genital feminino, podem ser componentes essenciais para o sucesso no local da fertilização. A integridade das macromoléculas da membrana espermática pode ser um importante componente da longevidade espermática (CRABO, 1974; PAVELKO e CRABO, 1976).

A motilidade uterina durante o cio e em sua resposta ao sêmen é comumente fator importante para o transporte espermático. Este transporte poderá ser afetado por algum constituinte do plasma seminal como a prostaglandina no sêmen de carneiro (GUSTAFSSON et al., 1977). A bioquímica da membrana é importante fator para a capacitação espermática, reação do acrossoma e fertilização (HUNTER e NORNES, 1969). Todos estes fatores podem afetar o transporte e a sobrevivência do espermatozóide no trato reprodutivo da fêmea.

Observações sugerem que o sêmen congelado tem vida consideravelmente mais curta no trato reprodutivo da égua comparado com o sêmen fresco. Entretanto, sugere-se que a rápida capacitação pode ocorrer em ambos, sêmen fresco e congelado. A razão para os diferentes tempos de sobrevivência entre o sêmen fresco e criopreservado não foi determinada. A criopreservação altera a habilidade do espermatozóide em ligar-se a ambas: células epiteliais do oviduto e zona pelúcida, mas o mecanismo para esta disfunção não é claro. Sugere-se que a habilidade do espermatozóide no sêmen congelado chegar ao oviduto, particularmente à ampola, é menor que a do espermatozóide no sêmen fresco (BADER, 1982).

Com relação aos índices de fertilidade nas inseminações artificiais com sêmen congelado de eqüino, MARTIN et al. (1979); MÜLLER, (1982); PICKETT et al. (1975), indicam uma variação entre 51,3% e 75%.

As taxas de prenhez por inseminação com o sêmen congelado são geralmente metade daquelas alcançadas com o sêmen diluído (PICKETT e AMANN, 1993). As baixas taxas de prenhez para o sêmen congelado poderiam ser explicadas por mudanças biofisiológicas que o espermatozóide sofre durante a criopreservação (TROEDSSON et al., 1998).

Observações clínicas sugerem que a inseminação com sêmen congelado resulta em inflamação uterina. Uma reação transicional, mas de pouca magnitude pode ser também observada em muitas éguas seguidas de monta natural ou inseminação artificial com sêmen fresco. Espermatozóides sozinhos (desprovidos de plasma seminal e contaminantes bacterianos), causam um influxo de neutrófilos polimorfonucleares no útero (TROEDSSON, 1995). Se a habilidade da égua para “limpar-se” fisiologicamente de uma inflamação uterina for prejudicada, esta inflamação irá persistir e transformar-se em endometrite com baixa fertilidade como resultado (TROEDSSON et al., 1993; LE BLANC et al., 1994; PYCOCK, 1994; TROEDSSON et al., 1995). Em adição, deve ser considerada a duração da inflamação pós-cobertura quando se realizam repetidas inseminações com sêmen congelado (TROEDSSON et al., 1998).

Somente 29,8% dos garanhões apresentam sêmen com qualidade para o procedimento de congelamento. As diferentes etapas do processamento para o congelamento do sêmen equino podem representar grandes variações nos resultados obtidos (KLUG et al., 1992). Testes de fertilidade no uso de sêmen congelado são usualmente baseados no número total de espermatozóides inseminados com a exigência de que a dose inseminante tenha no mínimo 30% de espermatozóides com motilidade progressiva após o descongelamento (MÜLLER, 1982; LOOMIS et al., 1983; LOVE et al., 1989; SAMPER, 1994).

As taxas de motilidade pós-descongelamento do sêmen variam entre garanhões e entre ejaculados do mesmo garanhão. As doses inseminantes geralmente contêm de 100 a 400 milhões de espermatozóides com motilidade progressiva após o descongelamento (COCHRAM et al., 1983; CRISTANELLI, 1984; HEITLAND, 1995). CRISTANELLI et al. (1983), descobriram que o sêmen descongelado permanece com a motilidade a 37° C por mais de 90 minutos.

A média da taxa de prenhez obtida por NEWCOMBE (1999), com sêmen congelado foi de 40%.

Os relatos do número de espermatozóides móveis necessários para maximizar as taxas de prenhez com sêmen congelado de garanhões são limitadas, mas uma dose inseminante de 500 milhões de espermatozóides com motilidade progressiva tem sido recomendada para otimizar as taxas de prenhez quando se utiliza sêmen fresco e diluído (PICKETT, 1987).

De acordo com os autores, o resultado da inseminação com sêmen congelado dependerá de muitos fatores os quais estarão relacionados com a qualidade do sêmen pré-congelamento e pós-descongelamento, o tipo de diluente e crioprotetor utilizado bem como a afinidade entre as células espermáticas e os diluentes/crioprotetores utilizados na técnica de congelamento, o número total de espermatozóides viáveis por dose inseminante (motilidade progressiva, integridade de acrossoma) e o momento da inseminação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi dividido em três experimentos conforme o quadro 1.

QUADRO 1. - PLANO EXPERIMENTAL

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL NA ÉGUA	
EXPERIMENTO A IA COM SÊMEN " <i>in natura</i> " 160 ÉGUAS	ESPÉCULO DE POLANSKY 80 ÉGUAS
	TÉCNICA MANUAL 80 ÉGUAS
EXPERIMENTO B IA COM SÊMEN DILUÍDO 142 ÉGUAS	TÉCNICA MANUAL 142 ÉGUAS
EXPERIMENTO C IA COM SÊMEN CONGELADO 123 ÉGUAS	ANTES DA OVULAÇÃO (12h) 65 ÉGUAS (TÉCNICA MANUAL)
	APÓS A OVULAÇÃO (6h) 58 ÉGUAS (TÉCNICA MANUAL)

3.1 EXPERIMENTO A

Inseminação artificial com sêmen “*in natura*” com espéculo de Polansky e pipeta orientada manualmente

Animais

Foram utilizadas 160 éguas da raça Crioula com idade entre três a 14 anos, que foram inseminadas na estação de monta nos meses de novembro a janeiro alocadas em propriedades da Região Metropolitana de Curitiba. Os animais foram divididos em dois grupos de 80 animais de diferentes categorias reprodutivas: cio induzido com PGF2 α no 20º dia pós-parto e éguas no segundo cio pós parto (30º dia), clínico-ginecologicamente sem alterações. O manejo alimentar foi realizado em pastagem de azevém, (*lolium multiflorum*) e trevo branco (*trifolium repens*) como pastagem de inverno e primavera, e no verão com pastagem de milheto (*penisetum americanum*) e sal mineralizado à vontade. O manejo sanitário dos animais foi realizado com administração de vermífugo periodicamente, vacinação contra raiva, tétano e influenza eqüina.

Controle folicular

As éguas foram controladas diariamente por palpação retal e ultra-sonografia (Aloka 210 model UST-5813N-5 serial nº 95800558) ovárica para o acompanhamento da dinâmica folicular. As inseminações foram realizadas quando o folículo atingia 30 mm, efetuando-se no máximo duas inseminações com intervalo de 36 h. Nas éguas recém-paridas, a inseminação artificial foi realizada somente no segundo cio, aproximadamente no 30º dia pós-parto. O controle acima descrito também foi realizado no experimento B.

Colheita de Sêmen

A colheita de sêmen do garanhão foi realizada com vagina artificial modelo Hanover, sendo em seguida filtrado o ejaculado e realizada sua avaliação macroscópica e microscópica. O ejaculado foi fracionado contendo cada dose inseminante 400 milhões de espermatozóides com motilidade progressiva, para imediatamente realizar a inseminação artificial. O mesmo procedimento foi realizado no experimento B.

Inseminação com espêculo de Polansky

Após a limpeza a seco da vulva, utilizou-se o espêculo de Polansky para a visualização do cérvix que, fixado por uma pinça de colo de útero (Albreschten), para a sua distensão em sentido caudal e facilitar a introdução da pipeta até o corpo do útero.

Aplicava-se a dose inseminante com seringa adaptada à pipeta de inseminação.

Inseminação artificial com pipeta orientada manualmente

A limpeza da vulva e região perineal foi realizada a seco e na seqüência foi colocada a luva plástica para toque retal lubrificada com soro fisiológico. A extremidade anterior da pipeta de plástico (modelo inseminação artificial para bovinos) foi protegida pela mão para a introdução na vagina sendo a mesma orientada pelo dedo indicador para passagem pela cérvix. O sêmen, em uma seringa de plástico adaptada à pipeta foi aplicado no corpo do útero.

Diagnóstico de gestação

As éguas inseminadas foram submetidas a exame ultrasonográfico e a palpação retal após 16 dias da data da inseminação, sendo o controle realizado a cada 10 dias até o 45º dia de prenhez para o diagnóstico de eventual reabsorção embrionária.

Eficiência reprodutiva

A eficiência reprodutiva de todos experimentos foi determinada levando-se em consideração o número de éguas inseminadas que apresentaram o parto com um potro normal.

3.2 EXPERIMENTO B

Inseminação artificial em éguas com sêmen diluído

Animais

Foram selecionadas 142 éguas da raça Crioula com idade de três a 14 anos de diferentes categorias reprodutivas (éguas com potro ao pé e éguas vazias) clínico-ginecologicamente sadias.

Avaliação e diluição do sêmen

Após a colheita do sêmen, o mesmo foi filtrado e mantido em temperatura ambiente (15 a 25° C), realizada a avaliação macro e microscópica. A diluição foi realizada com o diluente NAGASE e NIWA (1964) na proporção de 1:1.

Composição do diluente:

- 75 ml de lactose 11%
- 25 ml de gema de ovo.

O fracionamento do ejaculado foi efetuado para que cada dose inseminante obtivesse 400 milhões de espermatozóides com motilidade progressiva.

Logo após a diluição, o sêmen foi utilizado.

3.3 EXPERIMENTO C

Inseminação artificial em éguas com sêmen congelado antes e após a ovulação

Animais

Foram selecionadas 123 éguas da raça Brasileiro de Hipismo, com idade de três a 14 anos de idade e divididas em três categorias reprodutivas distintas de éguas: No cio do potro, cio induzido $\text{PGF2}\alpha$ no 20º dia pós-parto e éguas vazias com histórico reprodutivo clínico-ginecologicamente normais, em haras situados na Região Metropolitana de Curitiba.

As reprodutoras foram divididas em dois grupos:

Grupo 1: éguas inseminadas num período até 12h antes da ovulação

- 20 éguas inseminadas no cio do potro
- 22 éguas inseminadas no cio induzido com $\text{PGF2}\alpha$
- 23 éguas inseminadas no segundo cio pós-parto (30º dia).

Grupo 2: éguas inseminadas num período de até 6h após a ovulação

- 18 éguas inseminadas no cio do potro
- 20 éguas inseminadas no cio induzido com PGF2 α no 20º dia pós-parto
- 21 éguas inseminadas no segundo cio pós-parto (30º dia).

Controle da ovulação

O controle da dinâmica folicular das éguas foi realizado com ultra-sonografia (aparelho já descrito) sendo o exame realizado três a quatro vezes por dia com intervalo de seis a oito horas. A inseminação foi realizada pela técnica manual, com sêmen envazado em macrotubos e palhetas contendo cada dose inseminante 400 milhões de espermatozóides móveis e progressivos antes do congelamento. Como indicativo de ovulação na ultrasonografia, levou-se em consideração o diâmetro folicular, alteração da forma do folículo; e pela palpação folicular, a sensibilidade e a consistência da parede folicular, sendo a inseminação antes da ovulação no máximo de 12h e após a ovulação no máximo de 6h.

Análise estatística

A análise estatística dos dados de todos os experimentos foi realizada através do teste do qui-quadrado.

4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO A

Inseminação artificial em éguas com sêmen "*in natura*" utilizando o espéculo de Polansky e pipeta orientada manualmente.

Os resultados envolvendo as duas técnicas de inseminação artificial são mostrados na tabela 1. Dos 80 animais inseminados com a técnica do espéculo de Polansky, 65 éguas apresentaram gestação, perfazendo um total de 81,2% de prenhez. Foram efetuados exames ultrasonográficos de 16 a 45 dias de prenhez (a cada 10 dias) e os mesmos revelaram a incidência de três reabsorções embrionárias, perfazendo 4,6%. Durante a gestação foi observada neste grupo, a ocorrência de um aborto no 5º mês de gestação. Dos 80 animais pertencentes a este grupo, 61 mostraram eficiência reprodutiva atingindo percentual de 76,25%.

Dos 80 animais inseminados com a técnica da pipeta orientada manualmente, 63 éguas gestaram, com um total de 78,8% de índice de prenhez. Foram efetuados exames ultrasonográficos de 16 a 45 dias de gestação e estes revelaram a incidência de duas reabsorções embrionárias resultando em 3,2%. Durante a gestação foi observada neste grupo a ocorrência de um aborto no 3º mês de gestação. Nos 80 animais inseminados neste grupo, a eficiência reprodutiva foi em 60 éguas de 75%.

TABELA 1- RESULTADOS DE ÉGUAS INSEMINADAS COM AUXÍLIO DO ESPÉCULO DE POLANSKY E VIA MANUAL

	Espéculo de Polansky		manual	
	n	(%)	n	(%)
Nº de éguas	80		80	
% de gestação	65	81,25	63	78,8
% de reabsorção embrionária*	(65)3	4,6	(63)2	3,2
% de abortamento	1	1,5	1	1,6
eficiência reprodutiva	61	76,25	60	75

* 16-45 dias de gestação

4.2 EXPERIMENTO B

Inseminação artificial em éguas com sêmen diluído

Os resultados da inseminação artificial com sêmen “*in natura*” e diluído são mostrados na tabela 2.

Os resultados mostram que, das 160 éguas inseminadas com sêmen “*in natura*”, 128 gestaram, perfazendo um total de 80%. Destes 128 animais gestantes, cinco apresentaram reabsorção embrionária entre os 17 e 45 dias de gestação perfazendo um total de 3,9 % de índice de reabsorção, e quatro animais abortaram, sendo o índice de 3,1 % e uma eficiência reprodutiva de 74,3%. Das 142 éguas que foram inseminadas com sêmen diluído, 112 gestaram, perfazendo um total de índice de prenhez de 78,9%. Destes 112 animais gestantes, três apresentaram reabsorção embrionária, perfazendo um total de 2,6% de índice de reabsorção e três animais abortaram com índice de 2,6%. O total de éguas que apresentaram gestação a termo foi de 106, correspondendo a um índice de 74,6% de eficiência reprodutiva.

TABELA 2- RESULTADOS DE ÉGUAS INSEMINADAS COM SÊMEN “*IN NATURA*” E DILUÍDO*

	<i>“In natura”</i>		diluído	
	n	%	n	%
Nº de éguas inseminadas	160	100	142	100
% de gestação	128	80,0	112	78,9
% de reabsorção embrionária**	5	3,9	3	2,6
% aborto	4	3,1	3	2,6
% eficiência reprodutiva	119	74,3	106	74,6

*Diluyente: lactose 11% e gema de ovo

** 17-45 dias de gestação

4.3 EXPERIMENTO C

Resultado da Inseminação artificial na égua com sêmen congelado, antes e após a ovulação.

Os resultados da Inseminação artificial em éguas com sêmen congelado, antes e após a ovulação são mostrados nas tabelas três e quatro.

Éguas inseminadas 12 horas antes da ovulação

Foram observados que dos vinte animais inseminados no cio do potro, oito gestaram totalizando 40% de índice de prenhez. Dos 22 animais inseminados no cio induzido com PGF2 α no 20º dia pós-parto, 12 gestaram perfazendo um total de 54,5% de índice de prenhez. Dos 23 animais inseminados no 30º dia pós-parto, 14 gestaram resultando em 60,8% de índice de prenhez.

Éguas inseminadas após a ovulação

Foi observado que dos 18 animais inseminados no cio do potro, oito gestaram perfazendo um total de 44,4% de índice de prenhez e nos 20 animais inseminados no cio induzido com PGF2 α no 20º dia pós-parto, 11 gestaram totalizando 55% de

prenhez. Dos 21 animais inseminados no 30º dia pós-parto, 13 gestaram resultando em 61,9% de índice de prenhez.

TABELA 3- RESULTADOS DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM ÉGUAS COM SÊMEN CONGELADO ANTES E APÓS A OVULAÇÃO

Categorias reprodutivas	Antes da ovulação*			após a ovulação**		
	nºt.i	nºg	(%)	nºt.i	nºg	(%)
Cio do potro***	20	08	40,0	18	08	44,4
20º dia pós-parto(PGF2 α)	22	12	54,5	20	11	55,0
30º dia pós-parto	23	14	60,8	21	13	61,9

* <12 horas antes da ovulação

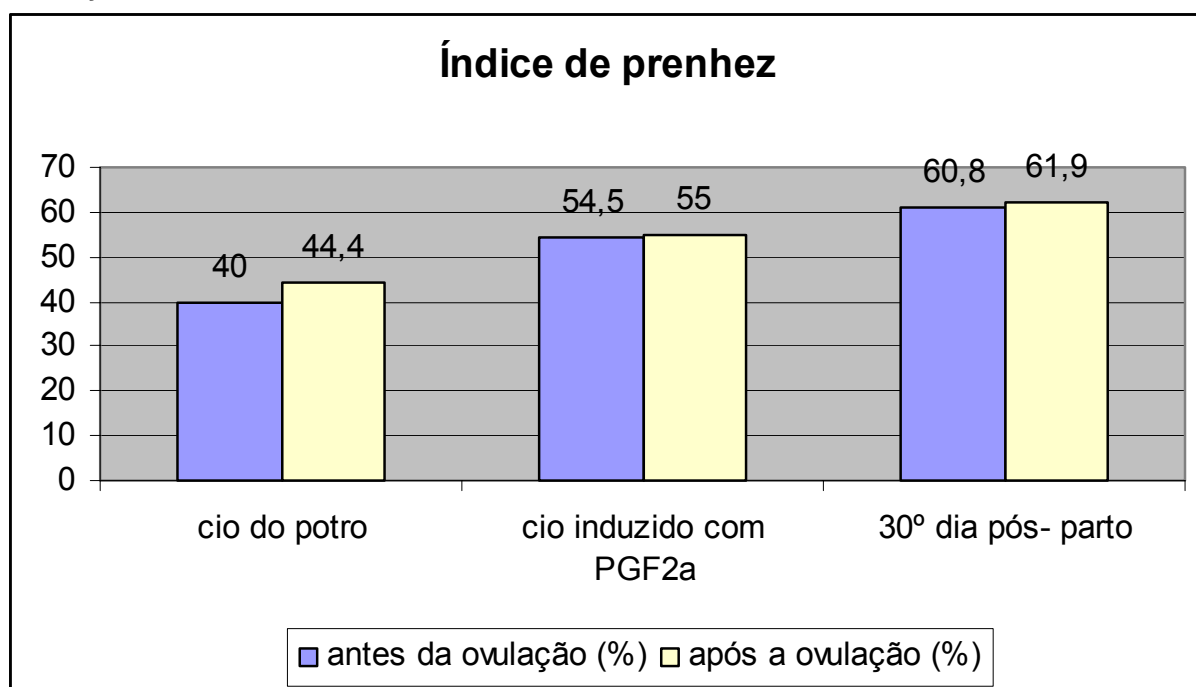
**< 06 horas após a ovulação

*** 1º cio pós-parto

nºt.i. – número total de éguas inseminadas

nºg – número de éguas gestantes

GRÁFICO 1 – ÍNDICES DE PRENHEZ EM ÉGUAS INSEMINADAS COM SEMEN CONGELADO NO CIO DO POTRO, CIO INDUZIDO COM PGF_{2 α} E 30º DIA PÓS PARTO ANTES E APÓS A OVULAÇÃO



Os resultados da inseminação artificial na égua com sêmen congelado são mostrados na tabela 4.

Na tabela 4 pode-se observar os resultados da inseminação artificial com sêmen congelado sendo que no grupo I, de 38 éguas inseminadas, 16 apresentaram gestação, sendo o índice de 42,1% de prenhez, das quais entre o 15º e 45º dia de prenhez, três apresentaram reabsorção embrionária (16,8%).

No grupo II, de 42 éguas que foram inseminadas, 23 gestaram, perfazendo um índice de prenhez de 54,8% sendo que uma égua apresentou reabsorção embrionária (4,3%).

No grupo III, de 43 éguas inseminadas, 27 gestaram, com índice de prenhez de 62,8% e duas reprodutoras apresentaram reabsorção embrionária (7,4%).

TABELA 4 – RESULTADOS DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL NA ÉGUA COM SÊMEN CONGELADO

CATEGORIAS	INSEMINADAS	GESTANTES		REAB. EMBRIONÁRIA*	
REPRODUTIVAS	n	n	(%)	n	(%)
Cio do potro***	38	16	42,1	3	16,8 ^a
20º dia pós-parto**	42	23	54,8	1	4,3 ^b
30º dia pós-parto	43	27	62,8	2	7,4
Total	123	66	54,2	6	9,1

* 15-45 dias de gestação

**indução do cio com PGF2 α

*** 1º cio pós-parto

^{ab} Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente $p < 0,05$

Os resultados das éguas inseminadas com sêmen congelado são mostrados nos gráficos 2 e 3.

GRÁFICO 2 – ÍNDICE DE PRENHEZ EM ÉGUAS INSEMINADAS COM SÊMEN CONGELADO

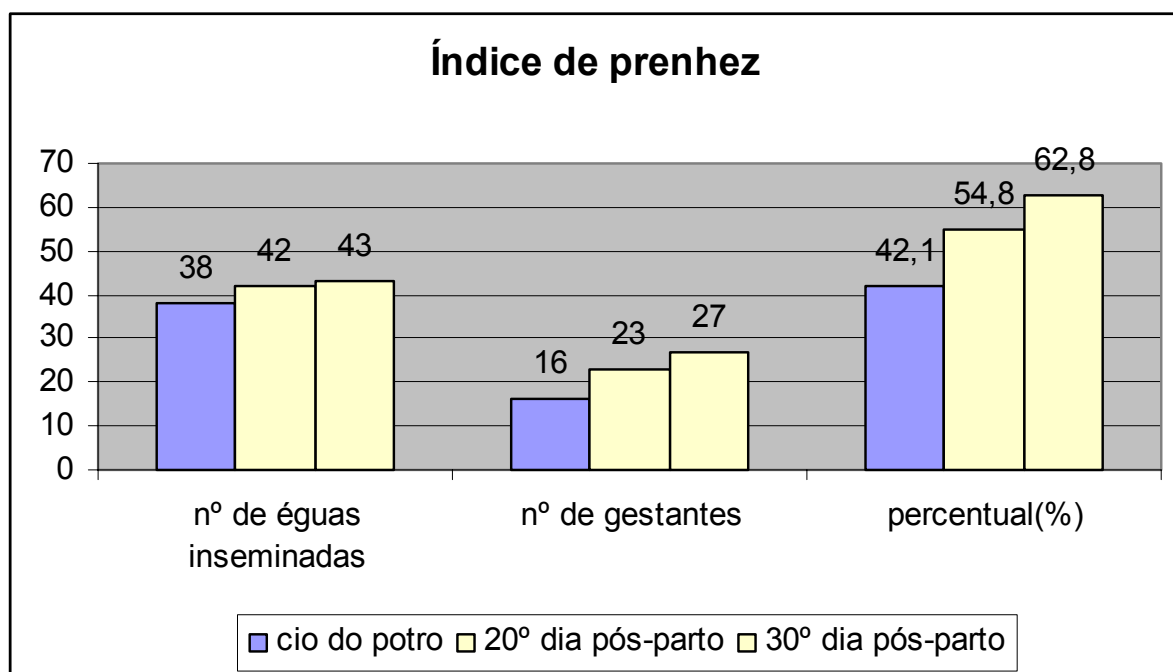
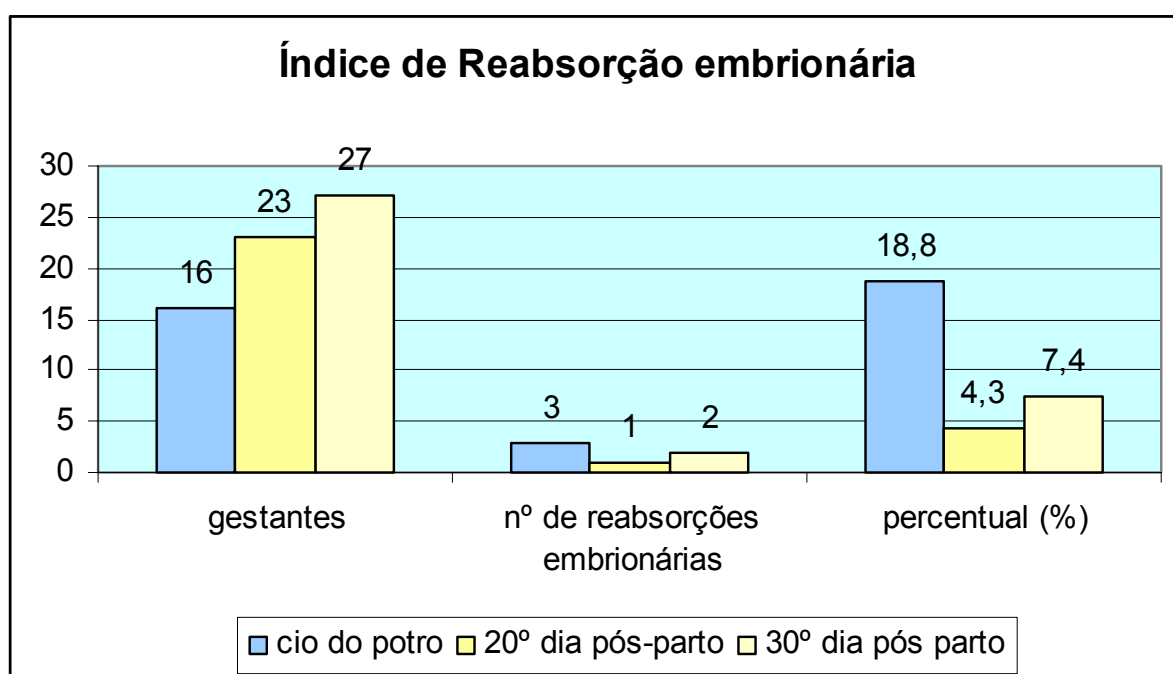


GRÁFICO 3- ÍNDICE DE REABSORÇÃO EMBRIONÁRIA NAS ÉGUAS INSEMINADAS COM SÊMEN CONGELADO



5 DISCUSSÃO

5.1 EXPERIMENTO A

Inseminação Artificial em éguas com sêmen “*in natura*” utilizando espéculo de Polansky e pipeta orientada manualmente.

Na avaliação estatística dos resultados encontrados entre as duas técnicas utilizadas, não houve diferença significativa quanto ao índice de prenhez, reabsorção embrionária, aborto e eficiência reprodutiva.

Os resultados semelhantes estão relacionados com o pequeno volume de sêmen aplicado sendo que KLUG (1987), e MATTOS e CAVALHEIRO (1988), observaram diferença acentuada na eficiência reprodutiva entre éguas cobertas naturalmente e inseminadas.

5.2 EXPERIMENTO B

Inseminação artificial na égua com sêmen “*in natura* e diluído

Os resultados dos dois grupos de éguas inseminadas logo após a colheita do sêmen não apresentaram diferenças significativas, não sendo necessária a diluição do sêmen. Entretanto, para a conservação do sêmen por um período mais longo, é necessária a diluição com meios enriquecedores (KENNEY, 1975; HEISKANEN et al., 1994; PICKETT e AMANN, 1987; BRINSKO e VARNER, 1992; BLANCHARD et al., 1987; PICKETT et al., 1975; PICKETT e VOSS, 1975).

5.3 EXPERIMENTO C

Inseminação artificial em éguas com sêmen congelado antes e após a ovulação

Os resultados das inseminações artificiais antes e após a ovulação deste experimento no grupo de animais inseminados no cio do potro (40%), assemelham-se aos observados por PALMER (1964), de 47%.

Considerando o grupo de animais inseminados antes da ovulação no cio induzido com PGF2 α (54,5%), verifica-se que são inferiores aos resultados obtidos por CHALHOUB et al. (1996), de 48% com o tempo de 48h antes da ovulação e inferiores aos de PALMER (1964), e de PAPA (1988), de 65-70%.

No grupo inseminado no 1º cio subsequente ao cio do potro, observou-se 60,8% de índice de prenhez, sendo inferior aos resultados encontrados por WOODS et al. (1990), de 63% e igual ao de SAMPER e MORRIS (1998), de 60%.

Em comparação aos resultados obtidos por VIDAMENT et al. (1997), de 21-32% e de NEWCOMBE (1999), de 40%, estes resultados foram superiores.

ROCHA et al. (1976), indicam a utilização do cio do potro para coberturas, entretanto, neste experimento observou-se um grande índice de concepção, porém com alta taxa de morte embrionária, concordando com as observações de SILVA et al, (1987), MERKT (1984) e ROCHA et al. (1976).

Mesmo que haja o estímulo para coberturas e inseminações no cio do potro, há uma incidência alta de contaminação por bactérias facultativamente patogênicas no lúmen uterino, incluindo *Streptococcus β -haemoliticum* (WEISS et al., 1976; GIGAX et al., 1979; NAGLIC et al., 1980; RIDEOUT et al., 1982).

Também é citada uma rejeição imunológica e anormalidades cromossômicas que provocam a morte embrionária (TOLSDORF, 1976), porém uma causa em maioria é citada por TOLSDORF (1976), POPE et al. (1979), SEXTON & BRISTOL

(1985), e SALTIEL et al. (1987), que afirmam como causa de baixa fertilidade do cio do potro a involução uterina incompleta.

De acordo com GIGAX et al. (1979), processos inflamatórios do endométrio que ocorrem durante o parto e cópula/inseminação, são os responsáveis pela baixa fertilidade.

Segundo LOY (1980), BELL e BRISTOL (1987), uma taxa de concepção maior é verificada em éguas que ovularam após o 10º dia pós-parto enquanto que McKINNON (1996), observou taxas de prenhez superiores, em éguas que ovularam após o 15º dia. Estes autores citam que as inseminações/coberturas de éguas que apresentam o cio do potro a partir do 9º-15º dia pós-parto, estão “limpas” fisiologicamente, estando prontas para a nova concepção. Além disso, todos os mecanismos envolvidos na involução uterina como a contração, evacuação dos lóquios, restauração da superfície epitelial e fagocitose bacteriana, são estimulados pelos níveis de estrógenos circulantes, justificando o aparecimento do cio do potro (VANDEPLASSCHE et al., 1983; EVANS et al., 1986; HAYES & GINTHER, 1986 e JONES et al., 1990).

Com relação as éguas inseminadas antes da ovulação, observa-se claramente que o maior índice de prenhez foi observado nas éguas inseminadas no cio induzido com $\text{PGF2}\alpha$ e no 30º dia pós-parto.

Observando-se o grupo de animais inseminados após a ovulação, nota-se que igualmente ao grupo I, o maior índice de prenhez ocorreu nas éguas inseminadas no cio induzido com a $\text{PGF2}\alpha$ e no 30º dia pós-parto.

Comparando-se os dois grupos (antes e após a ovulação), não observamos diferenças significativas entre as éguas inseminadas no cio do potro com índices de prenhez antes e após a ovulação de 40% e 44,4% respectivamente. As inseminações

realizadas no cio induzido com $\text{PGF2}\alpha$ não diferiram significativamente com índices de prenhez antes e após a ovulação de 54,5% e 55% respectivamente. As inseminações realizadas no 30º dia pós-parto não diferiram significativamente com índices de prenhez antes e após a ovulação de 60,8% e 61,9% respectivamente.

Com base na tabela 3, podemos afirmar que o horário da inseminação obtém melhores resultados de índices de prenhez, quando a mesma é realizada após a ovulação e quando realizadas nos animais que se apresentam após o cio do potro e no 30º dia pós-parto. Porém, HUNTER (1990), afirmou que a partir de 12h após a liberação do ovócito torna-se significativo um processo de degeneração nuclear o que leva a um pareamento imperfeito dos cromossomos no processo de mitose do zigoto, resultando na morte embrionária.

Entretanto, HEISKANEN et al. (1994), compararam inseminações realizadas 24h antes, inseminações realizadas 24-48h antes, com as inseminações realizadas no momento da ovulação e até 12h após a ovulação, resultando em uma taxa de fertilidade maior nas éguas inseminadas após a ovulação, sendo que o intervalo de até 12h para a inseminação após a ovulação garantiu a fecundação, eliminando a necessidade de maior sobrevivência espermática.

De acordo com PICKETT (1993), a inseminação com sêmen congelado antes da ovulação precisa ser realizada com 12-24h para que se obtenham as melhores taxas.

KLOPPE et al. (1988) e WOODS et al. (1990), concluíram que éguas inseminadas com sêmen congelado até 6h após a ovulação obtiveram taxas satisfatórias de prenhez.

Com base na análise do gráfico 2, pode-se afirmar que o índice de prenhez mais baixo verifica-se em éguas inseminadas no cio do potro. Valores semelhantes,

não significativos, diferem positivamente para as éguas inseminadas no cio induzido com PGF2 α e no 30º dia pós-parto, sendo que o melhor índice de prenhez foi observado nas éguas inseminadas no 30º dia pós-parto.

Analisando o gráfico 3, o qual mostra o índice de reabsorção embrionária, pode-se afirmar que o número de éguas que apresentaram morte embrionária foi maior no grupo inseminado no cio do potro, diferindo estatisticamente do segundo grupo.

O resultado do experimento realizado é semelhante aos achados de CHENG (1965), que afirma que a inseminação deverá ser realizada o mais próximo possível da ovulação, independentemente o horário (antes ou depois da ovulação).

Os resultados observados no experimento com relação às taxas de concepção nos animais inseminados antes e após a ovulação foram em média 51,1% e 53,7% respectivamente, resultados estes semelhantes aos de MARTIN et al. (1979), MÜLLER (1982), PICKETT et al. (1975) de 51,3 a 75% e superiores aos de NEWCOMBE (1999), de 40%.

Os resultados obtidos com inseminações após a ovulação (6h no máximo) no grupo de éguas do cio do potro (44,4%) deste experimento foram superiores aos de SAMPER (1998), de 30% , considerando que este autor realizou o procedimento com no máximo 12h após, justificando o baixo índice e igualando ao resultado de WOODS et al. (1990) que obtiveram a mesma taxa, porém, com inseminação de 12-24h após a ovulação. Já KATILA et al. (1998), obtiveram 29% de índice de prenhez em éguas inseminadas de 0 -27h após a ovulação.

O resultado deste experimento mostrou-se superior ao encontrado por PALMER (1964), de 18% em éguas inseminadas até 24h após a ovulação.

No grupo de animais inseminados após a ovulação cujo cio foi induzido com $\text{PGF2}\alpha$, o índice foi de 55%, assemelhando-se ao obtido por KOSKINEN et al. (1990) de 56 %, igual ao obtido por WOODS et al. (1990) de 55% no exato momento da ovulação, e dentro da variação observada por PALMER (1984), de 47 a 66%, para animais inseminados entre 0-72h após a ovulação.

No grupo de animais inseminados até 6h após a ovulação no cio subsequente ao cio do potro, o índice obtido neste experimento foi de 61,9% encontrando-se dentro da variação obtida por PALMER (1984), de 47 - 66% com inseminações de 0 – 72h após a ovulação.

Para as inseminações com sêmen congelado realizadas no cio do potro, os resultados deste experimento alcançaram um índice de 42,1% inferior ao observado por SILVA et al. (1987) de 66,6%. Esta diferença pode ser devida ao diagnóstico de gestação precoce (20 dias) sem a confirmação do mesmo após 45 dias, porém com relação às outras categorias reprodutivas observamos que, o cio do potro não é aconselhável para que se proceda à inseminação artificial, sendo que os índices de reabsorção embrionária foram significativamente maiores neste grupo comparado aos demais.

Os resultados da inseminação com sêmen congelado apresentam um índice de fertilidade de 54,2%. De acordo com MARTIN et al. (1979), MÜLLER (1972) e PICKETT et al. (1975), este índice varia entre 51,3% e 75%.

6 CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

1- Quanto ao índice de gestação, reabsorção embrionária, aborto e eficiência reprodutiva, não houve diferença significativa entre os grupos de éguas inseminadas com:

- Espéculo de Polansky e condução manual da pipeta,
- Sêmen "*in natura*" e diluído;
- Sêmen congelado antes e após a ovulação no cio induzido no 20º dia e segundo cio pós-parto;
- Índice de prenhez entre os grupos de éguas inseminadas no cio do potro.

2- Houve diferença altamente significativa quanto ao índice de reabsorção embrionária entre os grupos de éguas inseminadas com sêmen congelado no cio do potro.

3- O maior índice de prenhez foi observado nas éguas inseminadas no cio induzido com PGF2 α e no 30 º dia pós parto.

REFERÊNCIAS

- 1 ALEXANDER, S.L.; IRVINE, C.H.G.; SHAND, N.; EVANS, M.J. Is luteinizing hormone secretion modulated by endogenous oxytocin in the mare? Studies on the role of oxytocin and factors affecting its secretion in estrous mares. **Biology of Reproduction**, 361-371, 1995.
- 2 ALIEV, A.I. The effect of ovartropin on reproductive function of mares, and the optimum time of insemination with frozen-thawed semen. **Moskou Veterinarnie Akademie**, V.49, (abstracts 6815).1981.
- 3 ALLEN, N.R.; BOWEN, J.M.; FRANCK, C.J.; JEFFCOTT, L.B.; ROSSDALE, R.D. The current position of AI in horse breeding. **Equine Veterinary Journal**, v.8, p.72-74, 1976.
- 4 BADER, H. An investigation of sperm migration in the oviducts of the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, p.32; 59-64, 1982.
- 5 BADER, H.; KRAUSE, A. Investigation about the transport, distribution and the fate of spermatozoa in the genital tract of the mare. PROCEEDINGS 9TH INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 1980, 5:197-205.
- 6 BARBACINI, S.; MARCK, V.; ZAVAGLIA, G. Equine frozen semen: results obtained in Italy during the 1994-1997 period. **Equine Veterinary Education**, 11, 109-112, 1999.
- 7 BARKER, C.A.V.; GHANDIER, J.C.C.; Pregnancy in mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. **Canadian Journal Compendium of Medicine Veterinary Science**, 21:27-51, 1957.
- 8 BATELLIER, F.; DUCHAMP, G.; VIDAMENT, M.; ARNAULD, G.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Delayed insemination in successful with a new extender for storing fresh equine semen at 15° C under aerobic conditions. **Theriogenology**, 50: 229-236, 1998.
- 9 BEDFORD, S.J.; HENRICHS, K. The effects of insemination volume on pregnancy rates of pony mares. **Theriogenology**, 42: 571-578, 1994.
- 10 BEDFORD, S.J.; GRAHAM, J.K.; AMMAN, R.P.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W. The use of two freezing extenders to cool stallion spermatozoa to 5°C with or without seminal plasma. **Theriogenology**, 43: 939-953, 1995.

- 11 BELL, R.J.; BRISTOL, F.M. Fertility and pregnancy loss after delay of full estrous with progesterone and estradiol-17 β . **Journal Reproduction and Fertility**, 35, p.667-668, 1987.
- 12 BELLING, T. H. Postovulatory breeding and related reproductive phenomena in the mare. **Equine practice**, v.6, n.6, p.12-19, 1984.
- 13 BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; LOVE, C.C.; HURTGEN, J.P.; CUMMINGS, M.R.; KENNEY, R.M. Use of semen extender containing a antibiotic to improve the fertility of a stallion with seminal vesiculitis due to *Pseudomonas aeruginosa*. **Theriogenology**, v.28, n. 4, p. 541-546, 1987.
- 14 BLANCHARD, T.L.; VARNER, D. D.; BRINSKO, S. P.; MEYERS, S.A.; JOHNSON, L. Effects of post parturient uterine lavage of uterine involution in the mare. **Theriogenology**, v.32, n.4, p. 527-535, 1989.
- 15 BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; MEYERS, S.A. The effect of post breeding uterine lavage on pregnancy rate in mares. **Theriogenology**, 33; 465-475, 1990.
- 16 BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L. The effects of uterine lavage performed four hours post insemination on pregnancy rate in mares. **Theriogenology**, 35:1111-1119, 1991.
- 17 BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D. Artificial Insemination and preservation of semen. In: Blanchard, T.L.; Stallion management. Veterinarian Clinics of North America: **Equine Practice**, v.8, n.1, p. 205-208, 1992.
- 18 BRINSKO, S. P.; VARNER, D.D. Artificial insemination, In: VOSS, J.L., McKINNON, A.O. **Equine Reproduction**, Philadelphia, Lea & Febiger, 790-797, 1993.
- 19 BURKHAHNDT, J. Sperm survivor in the genital tract of the mare. **Journal of Agriculture Science**, 39; 201-203, 1949.
- 20 BURNS, S.J.; IRVINE, C.H.G.; AMOSS, M.S. Fertility of prostaglandin-induced estrous compared to normal post-part estrous. **Journal of Reproduction and Fertility**, 27: 245-250, 1979.
- 21 CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Relationships of age uterine function and reproductive efficiency in mares. **Theriogenology**, 37: 1101-1115, 1992.
- 22 CASLICK, E.A. The sexual cycle and its relation to ovulation with breeding records of the Thoroughbred mares. **Cornell Veterinary**, n.27, p. 187-206, 1937.

- 23 CHALHOUB, M; CARVALHO, G; FILHO, J.M.S; FILHO, A.L.R; OLIVEIRA, J.V.L. Fertilidade de éguas inseminadas com sêmen eqüino diluído, resfriado a 20°C e transportado a diferentes momentos da ovulação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**.1996.
- 24 CHENG, P.L. The application of some investigation of reproductive physiology in horse breeding practice in China. **China Journal of Agriculture Science**, Anim. Bred. Abstr. 33, v.7,p.7,1961.n.1,58,1965.
- 25 CLAVERT, A.; GABRIEL- ROBES, O.; MONZAGNON, D. Phisiologycal role of the seminal vesicle. **Programs of reproduction and biology medicine**, 12: 80-94, 1985.
- 26 COCHRAM, J.D.; AMMAN, R.P.; SQUIRES, E.L. & PICKETT, B.W. Fertility of frozen thawed stallion semen extend in lactose-edta-egg yolk extender and packaged in 1 ml straws. **Theriogenology**, 20, 735-741, 1983.
- 27 CRABO, B.G.; JEIENDRAN, R.S. Biochemical characteristics and its behavior during freezing and thawing. In: **Buffalo reproduction and artificial insemination**. FAO animal production and health. Paper 13, 261-271, 1974.
- 28 CRISTANELLI, M.J.; SQUIRES, E.L.; AMMAN, R.P.; PICKETT, B.W. Fertility of Stallion semen processed frozen and thawed by a new proceeding. **Theriogenology**, 22: 39-45, 1984.
- 29 DAY, F.T. Survival of spermatozoa in genital tract of the mare. **Journal of Agriculture Science**, 32: 108-111, 1942.
- 30 DOUGLAS – HAMILTOON, D.H. ET AL. A few study of fertility of transported equine semen. **Theriogenology**, 22: 291-304, 1984.
- 31 DROBINIS, E.Z.; OVERSTREET, J.W. Natural store of mammalian spermatozoa in the female reproductive tract. In: Oxford review of reproductive of biology, **Anais, Oxford**, 1992, 1-45.
- 32 EVANS, M.J.; HAMER, J.M.; GASON, L.M.; ASBURY, A.C.; ERVINE, C.H.G. Clearance of bacteria and non-antigenic marker following intra-uterine inoculation into maiden mares. Effects of steroid hormone environment. **Theriogenology**, v.26, n.1, p. 37-50, 1986.
- 33 GIGAX, A.P.; GAJAM, V.K.; KENNEY, R.M. Clinical, microbiological and histological change associated with uterine involution in mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, 27, p. 571-578, 1979.

- 34 GINTHER, O.J. **Biology Of the mare- basic and applied aspects**. Ann Arbor: McNaughton and Gunn, p.359-378, 1979.
- 35 GUSTAFSSON, B.K.; GRAHAN, E.; CRABO, B.G.; PAVELKO, M.K.; WAGNER, W.C. Prefreeze supplementation of ram semen with PGE1 and PGF2 α . Effects on sperm vitality in vitro and on sperm transport in the ewe. PROCEEDINGS 10TH ANNUAL MEETING SOCIETY OF STUDIES IN REPRODUCTION. AUSTIN, TX, 10, 1977.
- 36 HAYES, K.E.N.; GINTHER, O.J.; Role of progesterone and estrogen in development of uterine tone in mares. **Theriogenology**, v.25, p. 581-590, 1986.
- 37 HEISKANEN, M.; HUHTNEN, M.; PIHONEN, A.; MAENPO, A. A, P.H. Insemination results with slow-cooled stallion stored for 70 or 80 hours. **Theriogenology**, 42: 1043-1051, 1994.
- 38 HEITLAND, A.V.; JASKO, D.J.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L.; AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Motility and fertility of stallion spermatozoa cooled and frozen in a modified skim milk extender containing egg yolk and liposome. **Biology of Reproduction**, 1: 753-759, 1995.
- 39 HUGUES, J.P.; LOY, R.G. Artificial insemination in the equine. A comparison of natural breeding and artificial insemination of mares using semen from six stallions. **Cornell Veterinary**, v. 60, p. 463-475, 1970.
- 40 HUNTER, A.G.; NORNES, H.O. Characterization and isolation of a sperm coating antigen from rabbit seminal plasma with capacity to block fertilization. **Journal of Reproduction and Fertility**, 20: 419, 1969.
- 41 HUNTER, R.H. F.; Gamete lifespan in the mare's genital tract. **Equine Veterinary Journal**, v. 22, p.378-379, 1990.
- 42 JASKO, D.J.; HATHAWAY, J.A.; SCHALTENBRAND, V.L.; SIMPER, W.D.; SQUIRES, E.L. Effects of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, 37: 1241-1252, 1992.
- 43 JASKO, D.J.; MORAN, D.M.; FARLIN, M.E.; SQUIRES, E.L.; AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Pregnancy rates utilizing fresh, cooled, and frozen-thawed stallion semen. PROCEEDINGS OF AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTICE 38TH, ANNUAL CONVENTION, 649-660, 1992.
- 44 JENNINGS, W.M.E.; Some common problems in horse breeding. **Cornell Veterinary**, n.31, p.197-216, 1941.

- 45 JONES, D.M.; FELDEN, E.D.; CAR, D.H. Some pharmacological factor affecting uterine motility in mare. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF EQUINE REPRODUCTION, 5TH JULY 1ST- 7TH. Deuville, France, p.118-119, 1990.
- 46 KAMHI, S.; VARADIN, M. Time of breeding and ovulation in relationship with conception rate in mares. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 5, 1964, Trento: 1964, v.2, p.274-277. Anim. Breed. Abstr, v.33, n.1, abstr, 63, 1965.
- 47 KATILA, T.; KOSKINEN, E.; KUNTISI, H. et al. Fertility after post ovulatory inseminations in mares. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 11, 1988, Dublin: University college Dublin, v.2 (abstracts 96), 1988.
- 48 KEDROV, V.K. Insemination of mares after ovulation. Probl. Zivotn, n.3, p.33-35., 1944. ANIMAL BREEDING ABSTRACT; v.13, p.131, 1945.
- 49 KENNEY, R.M.; BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L.; MORSE, G.W. Minimal contamination technique for breeding mares: technique and preliminary findings. PROCEEDINGS OF AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTICE, v.21, 1975.
- 50 KLOPPE, L.H.; VARNER, D.D.; ELMORE, R.G.; BRITSLAFF, K.N.; SHULL, J.W. Effect of insemination timing on the fertilizing capacity of frozen-thawed spermatozoa. **Theriogenology**, 29: 429-439, 1988.
- 51 KLUG, E. Some new samenübertragung und embryo transfer beim Pferd. **Praktische Tieraezliche** v.68, p.21-25, 1987.
- 52 KLUG, E. Routine al application in the Hanoverian sport breeding association. **Animal Reproduction Science**, 28: 39-44, 1992.
- 53 KLUG, E.; MERKT, H.; GÜNZEL, A.R. Klinische erfahrungen mit prostaglandin F2 alpha. **Tieraezliche Presse**, n.5, p. 475-450, 1971.
- 54 KOSKINEN, E. et al. Fertility of mares after post ovulatory insemination. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 37, n. 1, p.77-80, 1990.
- 55 KOSKINEN, E.; KATILA, T. Uterine involution, ovarian activity and fertility in the post partum mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, 35:p.733-734, 1987.
- 56 KOTILANEN, T.; HUHTINEN, M.; KATILA, T. Sperm induced leukocytosis in the equine uterus. **Theriogenology**, 41: 629-636, 1994.
- 57 LAING, J.A. Observation on the survival of stored spermatozoa in the genital tract of the mare. **Journal of Agriculture Science**, v. 33, n.2, p. 64-66, 1943.

- 58 LE BLANC, M.M.; NEWIRTH, L.; ASBURY, A.C.; TRAN, T.; MAORAGIS, D.; KLAPSTEIN, E. Scientigraphic measurement of uterine clearance in normal mares and mares with recurrent endometritis. **Equine Veterinary Journal**, 36: 109-113, 1994.
- 59 LIEUX, P. Comparative results of breeding on first and second post foaling heat periods. PROCEEDINGS ON 26TH ANNUAL CONVETION OF AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTICE, p.129-132, 1980.
- 60 LIMA, M.C.C. **Sêmen eqüino: efeito da diluição, resfriamento a 20° C e transporte sobre a fertilidade**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 121p, 1995, Tese de Mestrado.
- 61 LOOMIS, P.R.; AMANN, R.P.; SQUIRES, E.L. et al. Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extend in EDTA-Lactose- egg yolk and packaged in straws. **Journal of Animal Science**, v. 56, p. 687-693, 1983.
- 62 LOY, R.G.; Characteristics of post partum reproduction in mares. **Veterinary Clinics of North America. Large animal practices**, 2: 345-359, 1980.
- 63 MANN, Y.; LUTWAK-MANN, C. Biochemistry of seminal plasma and male accessory fluids; application to andrological problems. In: **Male Reproductive function and semen**, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 269-336, 1981.
- 64 MANN, T.; POLGE, C.; ROWSON, L.E.A. Participation of seminal plasma during the passage of spermatozoa in the female reproductive tract of the pig and horse. **Journal of Endocrinology**, 13, 133-140, 1956.
- 65 MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GUNZEL, A.R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straw. **Journal of Reproduction and Fertility**, 27, 47-51, 1979.
- 66 MATHEUS, R.G.; ROPHIA, R. T.; BUTTERFIELD, R.M. The phenomenon of the foal heat in mares. **Australian Veterinary Journal**, v.43, p.579-582, 1967.
- 67 MATTOS, R. **Influencia de diferentes métodos de preservação de sêmen eqüino sobre a fertilidade, motilidade espermática e contaminação bacteriana**. 1975, Tese de Mestrado, Faculdade de Veterinária-UFRGS-Porto Alegre, Brasil.
- 68 MATTOS, R. C; CAVALHEIRO, E.T. Monta natura e inseminação artificial com sêmen fresco em éguas cruza árabe. In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 10. Porto Alegre, RS.**Anais do X Congresso Estadual de Medicina Veterinária**, p.46.1988.

- 69 McKINNON, A.O. **Artificial Insemination of cooled, transported and frozen semen.** Bain-Fallon lectures, Sidney, pp.319-377, 1996.
- 70 McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; HARRISON, L.A.; BLACH, E. L.; SHIDELER, R.K. Ultrasonographic studies on the reproductive tract of mares after parturition: effect of involution and uterine fluids on pregnancy rates in mares with normal and delayed first post partum ovulatory cycles. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 19, n.3, p.350-352, 1988.
- 71 MERKT, H. Equine Artificial Insemination. **Veterinary Record**, v.99, p.69-71, 1976.
- 72 MERKT, H. Informação pessoal (Klinik für Andrologie und Besamung der Háustiere. **Tierärztliche Hochschule Hanover.** Bischofsholer Damm, 15-Hanover, (República Federal da Alemanha), 1984.
- 73 MERKT, H.; GÜNZEL, A. A survey of early pregnancy losses in West German thoroughbred mares. **Equine Veterinary Journal**, v.11, n.4, p.256-258, 1979.
- 74 MÜLLER, Z. Fertility of frozen equine semen. **Journal of Reproduction and fertility**, 32, 47-51, 1982.
- 75 NAGASE, H.; NIWA, T. Deep freezing bull semen in concentrated pellet form. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFIAL INSEMINATION, 5, 1964, Trento. **Proceeding...**Trento, v.4, p.410-415, 1964.
- 76 NAGLIC, T.; TOPLINIC, E.; SUKALIC, M.; HAJSIG, D. The occurrence of bacteria and Mycoplasma in the stallion semen. **Veterinary Archives**, 50: 195-202, 1980.
- 77 NEWCOMBE, J.R. Practical evaluation of the fertilizing capacity of frozen-thawed horse semen. **Veterinary Record**, 145: 46-47, 1999.
- 78 NISHIKAWA, Y.; WAIDE, Y.; SHINOMIYA, S. Studies on deep-freezing of the horse spermatozoa. 6th INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 1968, 2: 1589-1591.
- 79 OVERSTREET, J.N.; Transport of gamete in the reproductive tract of the female mammal. In: Hartmann, J.R. **Mechanism and control of animal fertilization**, Academic Press, NY, 499-543, 1983.
- 80 PACE, M.M.; SULLIVAN, J.J. Effect of timing of insemination, numbers of spermatozoa and extended components on the pregnancy rate in mares

- inseminated with frozen stallion semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, 23, 115-121, 1975.
- 81 PALMER, E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 10, **Urbana. Proceeding...** Urbana University of Illinois, v.3, p.377-379. 1984.
 - 82 PAPA, F.O. Congelamento de sêmen e inseminação artificial, In: 7º CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, CAMPINAS/SÃO PAULO, 75-79, 1988.
 - 83 PAVELKO, M.K.; CRABO, B.G. Possible importance of the some sperm coating proteins and their behavior during preservation of boar semen. **Proceedings 8th INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION**, 1976, Cracow, Poland, 3: 455-462.
 - 84 PICKETT, B.W.; Seminal extender and cooled semen. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia, Lea & Febiger, pp. 746-754, 1993.
 - 85 PICKETT, B.W.; BURWASH, L.D.; VOSS, J.L.; BACK, D.G. Effect of seminal extender on equine fertility. **Journal of Animal Science**, v.40, n.6, p.1136-1146, 1975.
 - 86 PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. **Journal of Equine Veterinary science**. Wildomar- California, n.7, n.5, p.289-302, 1987.
 - 87 PICKETT, B.W.; SQUIRES, E.L.; McKINNON, A. O. Procedures for collection evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination, Fort Collins: Colorado State University. **Animal Reproduction Laboratory bulletin**, 3, 1987.
 - 88 PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Cryopreservation of semen. In: VOSS, J.L.; McKINNON, A.O. **Equine Reproduction**. Lea & Febiger, Philadelphia; p.769-789, 1993.
 - 89 PYCOK, J. A new approach to treatment of endometritis. **Equine Veterinary Education**, 6, 36-38, 1994.
 - 90 POPE, A.M.; CAMPBELL, D.L. & DAVISON, J.P. Endometrial histology of post partum mares treated with progesterone and synthetic GnRH (Ay-24, 031). **Journal of Reproduction and Fertility**, p.587-589, 1979.

- 91 RIDEOUT, M.I.; BURNES, S.J.; SIMPSOM, R.B. Influence of bacterial products on the motility of stallion spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, (32): 35-40, 1982.
- 92 ROCHA, A.L; JR, Z. O; MATTOS, R; GREGORY, R.M; MATTOS, R.C. Características puerperais, taxas de concepção e morte embrionária em éguas puro sangue de corrida cobertas no cio do potro. **Arquivos da Faculdade de Veterinária. UFRGS**, Porto Alegre, v.24, n.2, 1996.
- 93 SAULTIEL, A.; GUTIERREZ, A.; BUEN-LADO, N. e SOSA, C. Cervico-endometrial cytology and physiological aspects of the post Partum mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, 35, p.305-309, 1987.
- 94 SAMPER, J.V.; HELANDER, J.C.; CRABO, B.G. Relationship between the fertility of fresh and frozen semen and semen quality measured as sperm motility and with glass wool/sephadex filters. **Journal of Reproduction and Fertility**, 44: 107-114, 1991.
- 95 SAMPER, J.C.; MORRIS, C.A. Current method for stallion semen cryopreservation: a survey. **Theriogenology**, 19: 895-903, 1998.
- 96 SCOTT, M.A.; LIU, I.K.M.; ROBERTSON, K.R.; HANRATH, M.; OVERSTREET, J.W.; DROBINIS, E.Z. Acrossosomal status and movement characteristics of normal mares. **Proceedings 6th INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF EQUINE REPRODUCTION**, Caxambu, Brazil, 173-174, 1994.
- 97 SCOTT, M.A.; LIU, I.K M.; OVERSTREET. Sperm transport to the oviduct: Abnormalities and their clinical implications. **Proceedings, AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTICE**, 41:1-2, 1995.
- 98 SEXTON, P.F. e BRISTOL, F.M. Uterine involution in mares treated with progesterone and estradiol-17 β . **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.186, n.3, p.252-256, 1985.
- 99 SILVA, C. A.M; FARIAS, N.D.; NOGUEIRA, C.E.W.; ALDA, J.L. Inseminação artificial em eqüinos com sêmen congelado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, 11, (2): 95-101, 1987.
- 100 SILVA FILHO, J.M.N. **Aspectos do manejo reprodutivo e do sêmen na inseminação artificial de éguas**. Viçosa: Faculdade de zootecnia da UFV, 497p. Tese-Doutorado, 1994.
- 101 SILVA FILHO, J.M.; VALLE, G.R.; SATURNINO, H.M.; PALHARES, M.S; OLIVEIRA, H.N. Influência do intervalo entre a inseminação artificial com

- sêmen diluído resfriado e transportado e a ovulação sobre a fertilidade de éguas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.50, n.5, p.563-568, 1998.
- 102 TOLSKDORFF, E. Induction of ovulation during the post partum period in the thoroughbred mare with PGF2 α analogue syncrocept. **Theriogenology**, v.6, n.4, p.403-412, 1976.
 - 103 TROEDOSSON, M.H.T. Uterine response to semen disposition in the mare. Proc. Ann. Meet. Soc. **Theriogenology**, San Antonio, TX, 130-135, 1995.
 - 104 TROEDSSON, M.H.T.; LIU, I.K.M.; CRABO, B.G. Sperm transport and survival in the mare. **Theriogenology**, 49: 905-915, 1998.
 - 105 TROEDSSON, M.H.T.; CRABO, B.G.; IBRAHIN, M.; SCOTT, M.; ING, M. Mating-induced endometritis: mechanisms, clinical importance and consequences. **Proceedings**, AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTICES, 41: 11-12, 1995.
 - 106 TROEDSSON, M.H.T.; LIU, I.K.M.; ING, M.; PASCOE, J.R.; THURMOND, M. Multiplicity electromyography recordings of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. **Journal of Reproduction and Fertility**, 99: 307-313, 1993.
 - 107 TRUM, B.F. The estrous cycle of the mare. **Cornell Veterinary**, n.40; p.17-23, 1950.
 - 108 VAN RENSBURG, S.W.J.; VAN HERDEN, J.S. Infertility in mares caused by ovarian dysfunction. **Onderspoort Journal of Veterinary science**, v.26, p.285-313, 1953, anim. Bred. Abstr. V.22, 861, 1953.
 - 109 VANDEPLASSCHE, M.; BOUTERS, R.; SPINCEMAILLE, J.; BONTE, P.; CORYN, M. Observations on involution and puerperal endometritis in mares. **Irish Veterinary Journal**, n.37, p.126-132, 1983.
 - 110 VOSS, G.L.; PICKETT, B.W. Reproductive management of the broodmare. **Colorado State University Bulletin**. General series: 961, 1976.
 - 111 WEISS, R.R. Comunicação Pessoal-Setor de Ciências Agrárias. Departamento de Medicina Veterinária. Introdução da Inseminação Artificial no Brasil. 1976.
 - 112 WEISS, R.; BOHN, K.H.; MERKT, H.; KLUG, R.; HENSER, H. Untersuchungen zur Besiedlung der genital und Nasenschleimhaut des Pferdes, insbesondere des Hengstes mit in der Pferdazucht bedeutsamen bakteriellen infektiöserregern unter Berücksichtigung der Klebsiellen .II Morphologische und biochmisch

Untersuchungen na Kleibiellen. **Berlin Münch Tiererztliche.** Wochenschr. 89:
152-156, 1976.